ChinaXiv合作期刊

基础研究

非小细胞肺癌中TRIM25和PKM2蛋白表达

敬怀志[1],邱 峰[1],陈世知[2],粟 林[1],屈 灿[1]
[1]重庆医科大学附属第一医院药剂科,重庆 400016;[2]重庆医科大学附属第二医院核医学科,重庆 400010

摘 要:目的 检测临床非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)病人组织中TRIM25、PKM2蛋白的表达情况,探讨它们的关联性及意义。**方法** 应用组织免疫荧光法,检测TRIM25、PKM2蛋白在60例NSCLC组织和20例癌旁边正常肺组织(>5 cm)表达情况,同时运用Western blotting方法检测TRIM25、PKM2在10例新鲜NSCLC组织中表达情况,并结合标本的临床病理特征进行分析。**结果** TRIM25在60例非小细胞肺癌组织中的阳性表达率45%,而20例癌旁正常肺组织中仅为10%(P=0.005)。TRIM25在腺癌中阳性表达率为28.6%,而在鳞癌中为59.4%(P=0.017)。TRIM25被发现与TNM分期、淋巴结转移之间呈正相关性(P<0.05)。PKM2在60例非小细胞肺癌组织中表达率为73.3%,而在20例癌旁正常肺组织中为30%(P=0.001)。PKM2在腺癌的表达为57.1%,而在鳞癌中为87.5%(P=0.008)。通过关联性分析TRIM25和PKM2存在相关性(P=0.026)。Western blot结果表明当TRIM25表达升高时PKM2表达增长放缓。**结论** TRIM25、PKM2蛋白可能同时参与到NSCLC发生发展过程中,存在负相关性。
关键词:TRIM25蛋白;PKM2蛋白;癌细胞增殖;免疫荧光组织化学;Western blot

Tripartite-motif protein 25 and pyruvate kinase M2 protein expression in non-small cell lung cancer

JING Huaizhi[1], QIU Feng[1], CHEN Shizhi[2], SU Lin[1], QU Can[1]
[1]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Department of Nuclear Medicine, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chonging 400010, China

Abstract: Objective To investigate the expression of tripartite-motif protein 25 (TRIM25) and pyruvate kinase M2 (PKM2) protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) and explore their role in the occurrence and progression of NSCLC. **Methods** The expressions of TRIM25 and PKM2 protein were detected in 60 NSCLC specimens and 20 adjacent normal lung tissue (>5 cm from the lesions) with immunofluorescence histochemical method and in 10 fresh specimens of NSCLC with Western blotting. The results were analyzed in relation with the clinicopathological features of the patients. **Results** The positivity rates of TRIM25 expression was 45% in the 60 lung carcinoma specimens, significantly higher than that in the 20 normal lung tissues (10%, P=0.005). TRIM25 protein was expressed in 28.6% of lung adenocarcinoma tissues and in 59.4% of squamous carcinoma tissues (P=0.017). TRIM25 protein expression was positively correlated with the TNM stages and lymph node metastasis of NSCLC (P<0.05). The expressions of PKM2 protein in 60 cases of lung carcinoma was 73.3%,while in 20 cases of normal lung tissues the expressions was 30% (P=0.001). The positivity rates of PKM2 expression differed significantly between lung adenocarcinoma and squamous carcinoma (57.1% *vs* 87.5%, P=0.008). An inverse correlation was noted between TRIM25 and PKM2 expressions (P=0.026). **Conclusion** TRIM25 and PKM2 protein may participate in the occurrence and progression of NSCLC, and their expressions are inversely correlated.
Key words: tripartite-motif protein 25; pyruvate kinase M2; non-small cell lung cancer; immunofluorescence; Western blotting

三基序蛋白(tripartite-motif protein, TRIM)家族具有RBCC多结构域:RING、B-box和coiled-coil,作为E3连接酶[1],可以通过结合底物蛋白,让其发生泛素化/类泛素化降解或修饰,从而达到调控生物功能过程。目前研究表明TRIM家族具有抗病毒作用,并积极参与细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤发生发展等过程的调节[2]。TRIM25则通过泛素化或类泛素化调控生物功能过程,参加到肿瘤的进程中[3]。

收稿日期:2014-07-23
基金项目:重庆市卫生局医学科研重点项目
作者简介:敬怀志,研究生,硕士,E-mail: jhz99999@163.com
通信作者:邱 峰,教授,博士,E-mail: qiufeng.cn@gmail.com

M2型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)是糖酵解的限速酶,低氧环境下PKM2的高表达可帮助肿瘤细胞通过三羧酸循环和氧化磷酸化获得大量能量。因此PKM2对肿瘤的生长增殖有重要作用,但具体机制仍不清楚,同时有研究指出PKM2可能与E3连接酶蛋白相互连接发生作用参与到泛素化过程中[4]。

Qin等[5]已通过泛素化亲和提取试剂盒在非小细胞肺癌细胞株A549和耐顺铂株A549/CDDP细胞发现TRIM25、PKM2蛋白是有明显差异,但是在临床NSCLC病人中TRIM25和PKM2蛋白表达具体相关性是不清楚的。因此在研究中检测了TRIM25、PKM2在60例非小细胞肺癌病人及20例癌旁正常组织(>5 cm)

chinaXiv:201712.01120v1

ChinaXiv合作期刊

中的免疫荧光定位；同时用Western blotting测定10例NSCLC病人新鲜组织中两种蛋白的表达，有利于探讨临床中两种蛋白与NSCLC的关系，以期为肿瘤的发生、发展、治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

收集重庆医科大学附一院2011年5月~2012年2月间手术切除的60例NSCLC标本（经病理证实），其中28例腺癌，32例鳞癌；32例男性，28例女性；年龄38~75岁，中位年龄60.8岁；5例高分化癌，41例中分化癌，14例低分化癌；根据2009年世界肺癌大会的肺癌临床分期标准，16例I期，10例Ⅱ期，34例Ⅲ期；37例转移，23例无转移；34例有吸烟史，26例无吸烟史。进行免疫荧光组织化学实验，实验组为肿瘤组织，腺癌、鳞癌各取10例肿瘤旁边正常组织为对照组，经固定后石蜡包埋，4 μm厚切片。

同时从2012年5月~7月临床特征（年龄、性别、吸烟史、分化程度、TNM分期、肿瘤转移）相近中，各收集5例NSCLC腺癌、鳞癌新鲜组织，并取其癌旁正常组织(>5 cm)作为对照，用Western blotting方法检测TRIM25、PKM2蛋白表达。

1.2 主要试剂

TRIM25兔抗人单克隆抗体购自Sigma Aldrich公司，PKM2鼠抗人多克隆抗体购自Santa Cruz公司，驴抗山羊荧光二抗、山羊抗兔荧光二抗购自上海碧云天生物技术有限公司，DAB显色剂、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG和小鼠抗兔IgG购自北京中衫金桥公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫荧光组织化学 (1)主要步骤：把标本石蜡切片脱蜡后使用3%的过氧化氢去离子水封闭10 min，再用0.01 mol/L的柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)热修复，自然冷却后用山羊血清封闭30 min，然后滴加TRIM25单克隆抗体(1∶300)，在水槽上4 ℃过夜，复温1 h后滴加山羊抗兔荧光二抗(1∶200)，在37 ℃孵育1 h，50%甘油封片，在荧光显微镜下观察(×400)。

同时平行试验中PKM2多克隆抗体(1∶100)取代TRIM25单克隆抗体，滴加驴抗山羊荧光二抗(1∶200)；空白对照用PBS代替一抗；同时对切片做HE染色。

(2)结果判断：采用双盲法，判断NSCLC和正常组织TRIM25 、PKM2 蛋白的表达情况。在高倍镜(×400)下，随机读取每张切片的6个视野，每个视野中记数以荧光反应强为先的100个细胞。依照荧光阳性亮度强弱程度可分成：弱阳性1分；中等阳性2分；强阳性3分。依照阳性细胞数量，可分为：弱阳性(+，总数25%以下阳性细胞)；中等阳性(++，总数25%~49%之间阳性细胞)；强阳性(+++，总数50%以上阳性细胞)。采用综合计量方法，计算公式为：(+)%×1 +(++)%×2+(+++)%×3；总数值<1.0者为(+)，1.0-1.5者为(++)，>1.5者为(+++)。积分>1.0者为阳性表达，<1.0者为阴性表达。

(3)统计学分析：对所得数据采用SPSS 18.0统计软件进行检验，样本数据的比较使用卡方检验，同时对两个蛋白表达做关联性分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

1.3.2 Western blot 实验 (1)提取总蛋白：将取得的肺癌或旁边正常新鲜组织于4 ℃ 0.9%生理盐水中洗净、称量、研磨组织，按每100 mg组织加入0.5 ml的RIPA裂解液，反应30 min后在4 ℃下13 000 r/min离心30 min，取上清加入PMSF调至终浓度为1%，取少量蛋白提取液，使用紫外分光仪测定蛋白含量，标本储存于−80 ℃备用；(2)Western blot检测：将含80 μg蛋白质样品液与上样缓冲液混合，煮沸5 min，凝胶电泳分离蛋白，半干转法将蛋白质转至PVDF膜，室温下用5%脱脂奶粉封闭4 h，加入兔抗人TRIM25多克隆一抗(1∶200)，4 ℃过夜，加小鼠抗兔二抗(1∶100)，震动下孵育2 h，ECL显影，使用Quantity One 4.5软件进行光密度分析。

同时平行试验中PKM2多克隆抗体(1∶200)取代TRIM25单克隆抗体，滴加山羊抗小鼠二抗(1∶100)，同时都以兔抗鼠β-actin抗体对照实验。

2 结果

2.1 免疫荧光结果

2.1.1 TRIM 25在NSCLC中的表达及与临床病理因素的关系 TRIM25在60例NSCLC中阳性率为45%(27/60)，而癌旁组织中仅为10%(2/20)，差异具有统计学意义(P=0.005)。TRIM25在鳞癌中表达率高于腺癌，差异具有显著性(P=0.017)。 TRIM 25 表达与NSCLC组织分级、TNM 分期及淋巴结转移呈正相关性(P<0.05)，与患者的性别、年龄、吸烟史无关(P>0.05，图1，表1)。

2.1.2 PKM2在NSCLC中的表达及其与临床病理因素的关系 PKM2蛋白在60例NSCLC中阳性率为73.3%(44/60)，与非癌变肺组织表达阳性率30%(6/20)相比，有显著差异(P=0.001)。PKM2在鳞癌中表达高于腺癌，差异具有统计学意义(P=0.008)。NSCLC中PKM2蛋白的表达阳性率与组织分化、TNM分期、淋巴结转移、性别、年龄、吸烟史无明显相关性(P>0.05，图1，表1)。

2.1.3 NSCLC组织中TRIM25和PKM2蛋白表达之间的关系 在NSCLC腺癌、鳞癌中对TRIM25、PKM2蛋白通过关联性分析，发现两者存在关联性(χ^2=4.972，P=0.026，表2)。

2.2 Western blotting检测结果

PKM2、TRIM25蛋白在NSCLC中表达均高于正

chinaXiv:201712.01120v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.01120v1

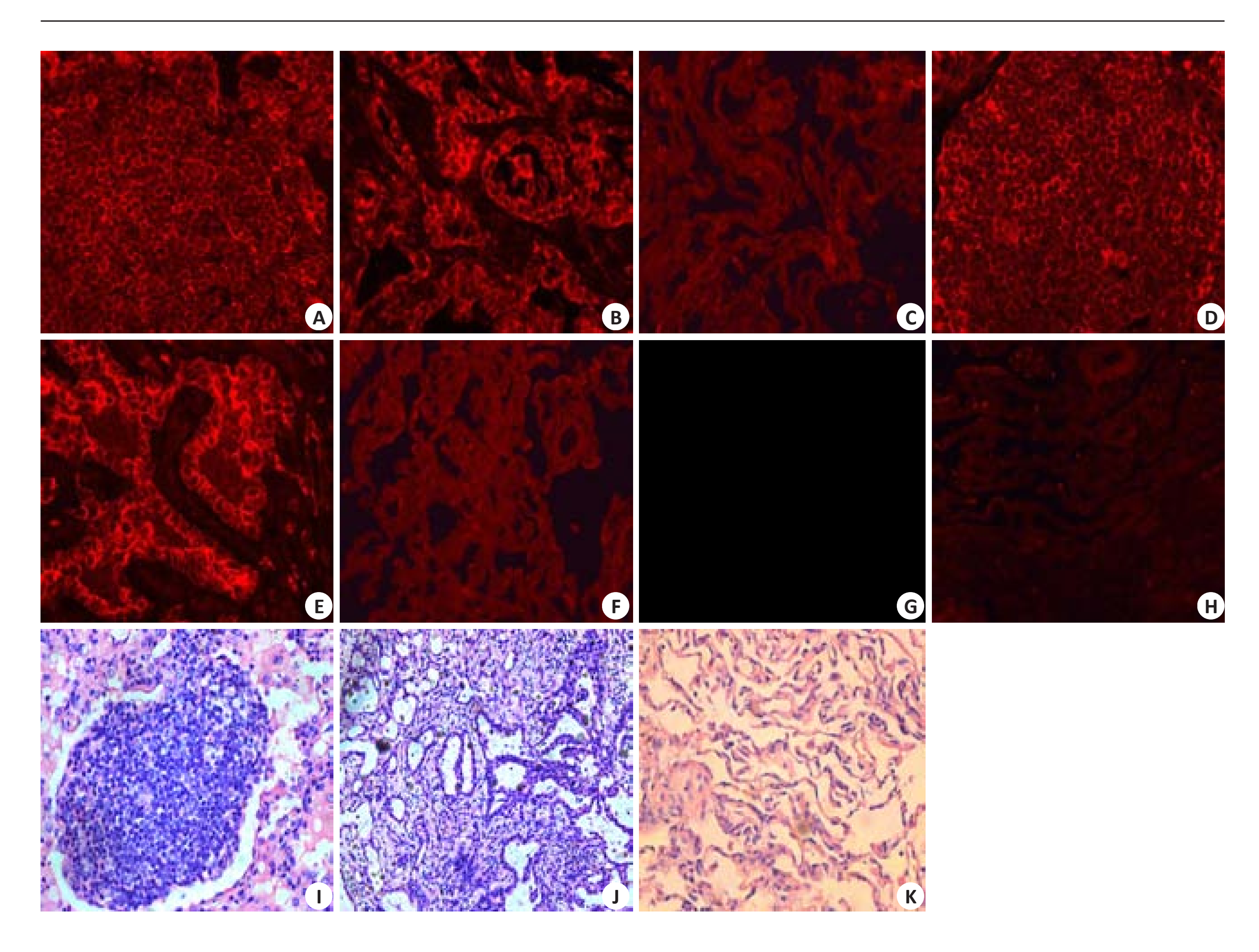


图1 对NSCLC和正常组织中TRIM25和PKM2蛋白表达的免疫荧光染色和HE染色

Fig.1 Immunofluorescence assay and HE staining of TRIM25 and PKM2 protein in NSCLC and normal lung tissues (Original magnification: ×400). ***A***: TRIM25 expression in lung squamous cell carcinoma; ***B***: TRIM25 expression in lung adenocarcinoma; ***C***: TRIM25 expression in normal lung tissue; ***D***: PKM2 expression in lung squamous cell carcinoma; ***E***: PKM2 expression in lung adenocarcinoma; ***F***: PKM2 expression in normal lung tissue; ***G***, ***H***: Negative control of TRIM25 and PKM2 in lung tissue; ***I***, ***J***, ***K***: HE staining of lung squamous cell carcinoma, lung adenocarcinoma, and normal lung tissue.

常肺组织；用Quantity One 4.5分析数据，PKM2、TRIM25蛋白在腺癌中表达高于鳞癌；TRIM25蛋白升高幅度大于PKM2表达，在癌症细胞中TRIM25高表达时PKM2表达有所降低(图2)。

3 讨论

3.1 在NSCLC中TRIM25的表达及意义

有些TRIM蛋白发挥双重的作用，既可以作为癌基因又作为抑癌基因[6-7]。TRIM25在其中具有代表性，它不仅作为免疫细胞感应器，同时它也作为癌基因促进乳腺癌的发生发展[2]，TRIM25可通过泛素化或类泛素化控制细胞周期抑制剂14-3-3δ调节细胞增殖[3, 8]。但TRIM25在其他肿瘤中是否也发挥相应作用、具体机制又是什么，这些都是目前研究的热点和难点。

本实验通过免疫荧光组织化学和WB实验均发现NSCLC组织中TRIM 25蛋白表达明显上调，说明其可能在NSCLC发生发展中起重要作用。TRIM25蛋白表达与NSCLC的组织分型、TNM分期、淋巴转移密切相关，提示TRIM25蛋白在临床上的不同NSCLC病理分型中表达存在区别，这些差异关联到病人的预后效果，为今后NSCLC诊疗研究提供了新的思路。

3.2 在NSCLC中PKM2的表达及意义

在肿瘤中PKM2通过协同低氧诱导因子1α，能够促进需氧糖酵解和肿瘤血管生成[9]，PKM2有可能成为肿瘤预后判断[10]。本研究显示，在NSCLC组织中PKM2蛋白的表达显著高于非癌变肺组织，证实PKM2蛋白高表达可能促进NSCLC的生长；PKM2蛋白在NSCLC的腺癌和鳞癌中表达量的差异具有统计学意义，与目前国内外的研究结果相同，同时这些结果可能成为非小细胞肺癌研究提供依据。

3.3 TRIM25与PKM2蛋白的相关性

上文阐述TRIM25作为泛素化E3连接酶，可通过

ChinaXiv合作期刊

表1 TRIM25和PKM2蛋白在NSCLC中表达情况

Tab.1 TRIM25 and PKM2 protein expressions in non-small cell lung cancer

Clinical types	Case (*n*)	TRIM25				PKM2			
		Negative	Positive	χ^2	*P*	Negative	Positive	χ^2	*P*
Age (years)									
<60	43	22	21	0.903	0.342	11	32	0.091	0.762
≥60	17	11	6			5	12		
Gender									
Male	32	15	17	1.829	0.176	10	22	0.737	0.391
Female	28	18	10			6	22		
Smoking history									
Yes	34	22	12	2.986	0.084	9	25	0.002	0.969
No	26	11	15			7	19		
Pathological type									
Adenocarcinoma	28	20	8	5.725	0.017	12	16	7.737	0.008
Squamous	32	13	19			4	28		
Normal	10	9	1	4.375	0.036	7	3	7.296	0.007
Degree of differentiation									
Well-differentiated	5	1	4	6.157	0.046	3	2	4.500	0.105
In differentiation	41	20	21			8	33		
Poorly differentiated	14	12	2			5	9		
TNM staging									
Ⅰ-Ⅱ	26	19	7	6.058	0.014	8	18	0.395	0.530
Ⅲ-Ⅳ	34	14	20			8	26		
Lymph node metastasis									
N0	37	25	12	6.616	0.013	12	25	1.641	0.200
N1-3	23	8	15			4	19		

表2 TRIM25和PKM2蛋白在NSCLC中相关性

Tab.2 Correlation between TRIM25 and PKM2 proteins in non-small cell lung cancer

PKM2	TRIM25		Total
	Positive	Negative	
Positive	16	28	44
Negative	11	5	16
Total	27	33	60

泛素化或类泛素化参加到生物过程,同时类泛素化修饰可能会发生在PKM2蛋白上,XIA QIN等通过实验提示TRIM25、PKM2在肺癌细胞株A549耐药中可能同时发挥作用[11]。这些研究表明TRIM25、PKM2蛋白可能同时参与到泛素化或类泛素化,因此TRIM25、PKM2蛋白是否可能通过泛素化或类泛素化作用相互在肺癌中发生发展中发挥作用。本研究中免疫荧光组织化学证实在NSCLC组织中TRIM25、PKM2表达明显高于正常肺组织,它们存在相关性;同时WB试验也测得在NSCLC组织中TRIM25、PKM2蛋白表达明显升高,当TRIM25表达升高时PKM2表达有增长放缓的趋势。

综上所述在NSCLC组织中TRIM25、PKM2蛋白均高表达,当TRIM25表达增高时PKM2的表达增加量明显有放缓的趋势现象,本课题组在对A549/DDP细胞株中进行沉默TRIM25基因时PKM2有表达增加,说明TRIM25、PKM2可能在特定的外部环境刺激下可激活它们发生相互作用。此外值得注意的是泛素化或类泛素化也与抗肿瘤药物出现多耐药的现象相关[12],PKM2可能参与到多耐药的发生之中[13],这为我们下一步研究提供新的思路,同时也为目前肿瘤耐药研究提供新的途径。

参考文献:

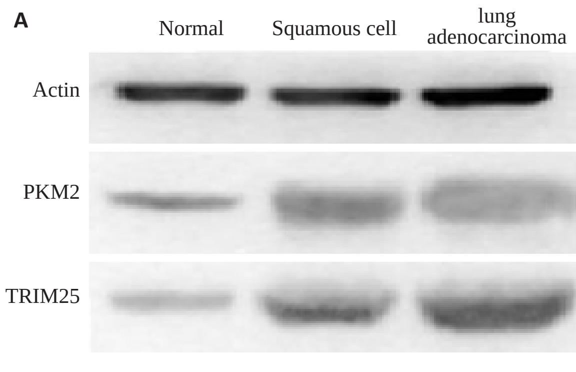
[1] Mcnab FW, Rajsbaum R, Stoye JP. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1): 46-56.

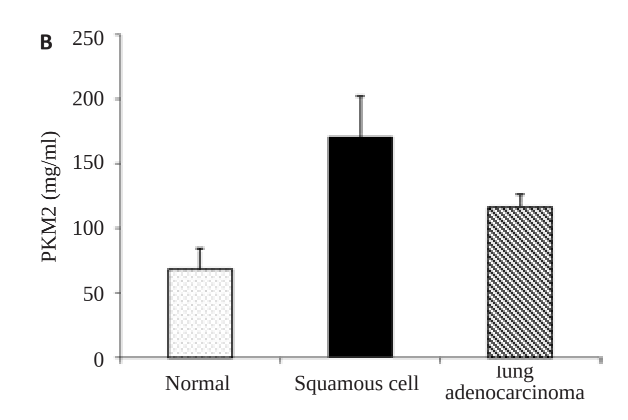
[2] Rajsbaum FM. Jonathan P StoyeAnne O'garra. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1): 46-56.

[3] Nakamura Y, Oshima K, Naoi Y, et al. 14-3-3 sigma expression is associated with poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancers[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 229-36.

chinaXiv:201712.01120v1

ChinaXiv合作期刊





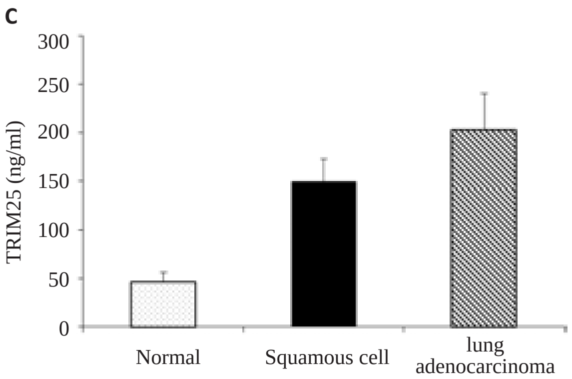


图2 使用Western blot方法对TRIM25和PKM2蛋白表达的分析结果

Fig.2 Western blotting of TRIM25 and PKM2 protein expressions in different lung tissues. *A*: Western blotting of TRIM25 and PKM2 protein expression in lung adenocarcinoma, squamous cell and normal tissue; *B*: Quantitative analysis of TRIM25 and PKM2 protein expressions.

[4] Chaneton B, Gottlieb E. Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer[J]. Trends Biochem Sci, 2012, 37(8): 309-16.

[5] Qin X, Chen S, Qiu Z, et al. Proteomic analysis of ubiquitination-associated proteins in a cisplatin-resistant human lung adeno-carcinoma cell line[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5): 791-800.

[6] Oh YT, Yue P, Zhou W, et al. Oncogenic Ras and B-Raf proteins positively regulate death receptor 5 expression through co-activation of ERK and JNK signaling[J]. J Biol Chem, 2012, 287 (1): 257-67.

[7] Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8212-7.

[8] Ketscher L, Basters A, Prinz M, et al. mHERC6 is the essential ISG15 E3 ligase in the murine system[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1): 135-40.

[9] Irene C, Aki M, Colmenares SU, et al. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1 a domain to complete recombinational repair[J]. Cell, 2011, 144(5): 732-44.

[10] Fatela-Cantillo D, Fernandez-Suarez A, Marin Moreno MA, et al. Prognostic value of plasmatic tumor M2 pyruvate kinase and carcinoembryonic antigen in the survival of colorectal cancer patients[J]. Tumor Biol, 2012, 33(3, SI): 825-32.

[11] 秦 霞, 邱宗荫, 邱 峰, 等. 人肺腺癌耐药细胞株A549/CDDP中相关泛素化蛋白质研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 5(9): 866-9.

[12] Martinez-Balibrea E, Plasencia C, Ginés A, et al. Aproteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to ox aliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(4): 771-8.

[13] Desai SD, Li TK, Rodriguez-Bauman A, et al. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resus-tabce mechanismto camptothecin in tumor cells [J]. Cancer Res, 2001, 61(15):5926-32.

（编辑：吴锦雅）

chinaXiv:201712.01120v1